

Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas

Manoela de Souza Araújo Silva,^{*1} Maria Angélica R. Silva,² Jane Sheila Higino,³ Maria S. Vieira Pereira,² Alessandra de A. T. Carvalho¹

¹Departamento de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife-PE, Brasil,

²Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa-PB, Brasil,

³Departamento de Farmácia, Centro de Ciências e da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, 50740-521 Recife-PE, Brasil

RESUMO: Neste estudo foi investigada a ação antimicrobiana e a inibição de aderência *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) sobre cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Os ensaios foram realizados pelas técnicas de ágar-difusão em placas de Petri para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e técnica de tubos inclinados para determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) ao vidro, na presença de 5% de sacarose. Os mesmos procedimentos foram realizados com a clorexidina à 0,12%. As CIMs (mg/mL) do extrato de *Rosmarinus officinalis* sobre *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 27609 e *L. casei* ATCC 7469 foram 1:1, 1:4, 1:1 e 1:4, respectivamente. Não houve inibição de crescimento de *S. mitis* ATCC 98811. As CIMAs do extrato de *Rosmarinus officinalis* frente a *S. mitis* ATCC 98811, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. sobrinus* ATCC foram 1:8, 1:16 e 1:8, nessa ordem. Os resultados sugerem a possibilidade de uso do extrato de alecrim como antimicrobiano oral. No entanto, modelos de estudo que possam reproduzir situações mais próximas àquelas encontradas na cavidade oral são requeridas para avaliação de agentes antimicrobianos no tratamento e prevenção de infecções orais biofilme-dependentes.

Unitermos: *Rosmarinus officinalis*, Labiatae, atividade antimicrobiana, efeito antiaderente, bactérias planctônicas, *Streptococcus*.

ABSTRACT: “*In vitro* antimicrobial activity and antiadherence of *Rosmarinus officinalis* Linn. against oral planktonic bacteria”. In this study was investigated the antimicrobial activity and *in vitro* adherence inhibition of a hydro alcoholic *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) on standard strains of *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 and *Lactobacillus casei* ATCC 7469 extract. The test was carried out by inundation techniques in Petri dishes to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and inclined tubes techniques the Minimum Inhibitory Concentration of Adherence to glass (MICA) at the presence of 5% sucrose. Tests with gluconate of chlorexidine 0.12% were performed as controls. MICs of the *Rosmarinus officinalis* extract dilutions (mg/mL) against *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 27609 and *L. casei* ATCC 7469 were 1:1, 1:4, 1:1 e 1:4, respectively. The extract from alecrim inhibited all the standard strains growth tested, except for *S. mitis* ATCC 98811. MICAs of the *Rosmarinus officinalis* extract dilutions (mg/mL) against *S. mitis* ATCC 98811, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. sobrinus* ATCC were 1:8, 1:16 e 1:8, respectively. The results suggest that there is a possibility of the alecrim use as an oral antimicrobial. Nevertheless, study models which could reproduce situations similar to those seen in bucal caries are necessary for the antimicrobial agents evaluation in the treatment and biofilm dependant oral infections prevention.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, Labiatae, antimicrobial activity, antiadherent effect, planktonic bacteria, *Streptococcus*.

INTRODUÇÃO

No contexto da sociedade moderna, é crescente

o interesse em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especificamente aqueles derivados de plantas (Rates, 2001; Albuquerque & Hanazaki, 2006;

Oliveira et al., 2007). Sendo a fitoterapia considerada pela OMS em seu programa de saúde (OMS, 1991). No Brasil, plantas medicinais são popularmente utilizadas sob diversas formas, como chá, xarope e tinturas (Matos, 1997). No entanto, o uso oficial dessas fontes terapêuticas nos serviços de saúde requer o conhecimento científico para a transformação dessas plantas em fonte terapêutica de uso seguro, racional e benéfico (Rates, 2001; Michilis, 2004; Tôrres et al., 2005; Vendruscolo et al., 2005; Silva et al., 2006).

Na região Nordeste do Brasil, as folhas de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) tem sido utilizada popularmente com propriedades anti-hipertensiva e digestiva (Agra et al., 2007). O alecrim é um arbusto aromático de pequeno porte da família Labiatae, cujas folhas abrigam pequenas glândulas contendo óleo aromático (Al-Sereiti et al., 1999). Seu óleo essencial é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3- octanona e acetato de isobornila. Os terpenóides são representados pelo carnosol, ácidos carnosílico, oleânico, ursólico, entre outros. Os flavonóides incluem diosmetina, diosmina, gencuanina, luteolina, hispidulina e apigenina. Apresenta ainda os ácidos rosmarínico, caféico, clorogênico, neoclorogênico e labiático (Alonso, 1998).

Dentre as ações farmacológicas de *R. officinalis* tem-se observado atividade hipoglicemiante, inibidor da enzima acetilcolinesterase e α -amilase, (Barbosa-Filho et al., 2005; Barbosa-Filho et al., 2006; Funke et al., 2006). Também foi encontrado atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias Gram- positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Vibrio colere*, *Escherichia coli*, *Corinebacterium*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas fluorenses*, *Rhodotorula glutinis* e *Kluyveromyces bulgaricus* (Newall et al., 2002), *Micrococcus luteus*, *Salmonela* spp. e *Listeria monocitogens* (Alonso, 1998). Porém, poucos estudos relatam o efeito antimicrobiano do alecrim sobre bactérias orais.

Sabe-se que a cárie e a doença periodontal são infecções decorrentes de acúmulo de bactérias na superfície dentária formando um biofilme, cuja remoção mecânica constitui o método mais seguro para manter níveis adequados de higiene oral (Pinto, 2000). No entanto, a experiência clínica e estudos populacionais demonstram que tal método não tem sido empregado de forma adequada por parte da população (Barnett, 2003). Diante das considerações feitas, este estudo investigou a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de alecrim sobre bactérias orais planctônicas.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção do material botânico e preparo do extrato

Rosmarinus officinalis Linn. (folhas e caules) foi obtida do canteiro de plantas do Departamento de

Antibióticos do Campus da UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil e identificada botanicamente no Laboratório de fitomedicamentos do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco. Em seguida, folhas e caules foram separados, pesados, lavados em água corrente e submetidos ao processo de maceração por um período de 19 dias à temperatura ambiente. Nesta etapa, foi utilizada como solução extratora uma solução hidroalcoólica a 80% v/v por se tratar de uma planta aromática, rica em óleos essenciais, visando à obtenção de todos os componentes químicos do alecrim durante a maceração, segundo protocolo do Laboratório de Fitomedicamentos do Departamento de Farmácia da UFPE. Assim, foram utilizados 1400 mL de solução hidroalcoólica para 350,5 g de matéria prima fresca. Decorrido o período de maceração, o material foi filtrado, para remoção de resíduos sólidos, obtendo-se 1335 mL de extrato, havendo perda por evaporação de 65 mL. Após filtração, o extrato foi acondicionado em frascos âmbar, previamente limpos e secos, e estocados em câmara fria. Foi obtido um extrato de cor verde-oliva, odor cítrico adocicado e sabor adstringente, levemente amargo.

Linhagens bacterianas

Utilizou-se neste estudo linhagens bacterianas padronizadas de *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469, obtidas mediante solicitação na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tozello” (Campinas- SP) e Instituto Adolfo Lutz (São Paulo- SP), respectivamente.

Determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn.

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre as linhagens bacterianas. As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo BHI (Brain Hear Infusion- DIFCO). Foram realizadas perfurações no meio de cultura (Agar Müller Hinton - DIFCO) de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Nos orifícios foram colocados um volume de 50 μ L da solução do extrato diluída, variando da diluição 1:1 a 1:512. As placas foram incubadas em estufas bacteriológicas a 37 °C em microaerofilia, por um período de 24 horas. Foram realizados estudos comparativos com clorexidina a 0,12%. Os ensaios foram realizados em duplicata frente a cada linhagem ensaiada. A CIM foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano, ou seja, presença do halo de inibição.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA)

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência da bactéria ao vidro foi determinada na presença de 5% de sacarose, usando-se concentrações crescentes e dobradas da solução diluída do extrato, variando de 1:1 a 1:512. A partir do crescimento "overnight", as linhagens foram subcultivadas a 37 °C em caldo Müller-Hinton (DIFCO), em microaerofilia, por um período de 24 horas, obtendo-se um inóculo de 10⁶ UFC/mL. A incubação foi feita a 37 °C por 24 horas em microaerofilia, com os tubos inclinados a 30°. A CIMA foi definida como a menor concentração do extrato em meio com sacarose que impediu a aderência bacteriana ao tubo de vidro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes com agentes antimicrobianos sobre bactérias orais planctônicas podem qualificar o agente para tratamento de infecções orais biofilme-dependentes ou desqualificá-lo, caso esses testes demonstrem resultados negativos (Costerton et al., 1987).

Nas últimas décadas, os fitofármacos têm assumido um importante papel como meio terapêutico alternativo na odontologia, mediante suas propriedades antimicrobianas frente às afecções bucais (Gebara et al., 1996; Pereira, 1998; Melo et al., 2006; Pereira et al., 2006; Silva et al., 2007; Kreuger et al., 2007; Simões et al., 2008). No entanto, poucos estudos na literatura relatam sobre as propriedades biológicas do alecrim sobre bactérias orais.

Takarada et al. (2004), afirmam que o óleo essencial de alecrim demonstrou efeito inibitório da aderência de *S. mutans* e atividade inibitória do crescimento de bactérias Gram-negativas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*).

Nesse estudo buscou-se verificar a ação do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, espécies bacterianas predominantes no biofilme supragengival, e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Os resultados demonstraram a eficácia do extrato de alecrim sobre as linhagens ensaiadas. Todas as linhagens foram sensíveis ao extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis*, exceto *Streptococcus mitis* ATCC 9811. Foram observados halos de inibição de crescimento bacteriano que variaram de 11 mm a 18 mm de diâmetro, sendo considerado ativo o extrato que mostrou halos de inibição superior a 12 mm. A inibição do crescimento apresentou-se homogênea, de acordo com o grau de concentração do extrato hidroalcoólico de alecrim. Houve diminuição proporcional do diâmetro dos halos de inibição, à medida que a concentração do extrato foi diminuída, conforme apresentado na Tabela 1. Esses achados sugerem que o extrato de alecrim possui

compostos bioativos com atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as cepas de *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

Com relação a clorexidina foram observados resultados semelhantes com uma proporcionalidade entre diminuição do diâmetro dos halos de inibição e a diminuição da concentração da substância (Tabela 2).

A clorexidina, por ser um agente catiônico, é adsorvida às superfícies oral e bacteriana carregadas negativamente, interferindo no equilíbrio osmótico bacteriano, formação de película adquirida e adsorção bacteriana ao dente. Em adição, tem sido constatado *in vivo* a capacidade da clorexidina de reduzir a formação de biofilme (Del Bel Cury et al., 1994) e de inibir a síntese de polissacarídeos insolúveis da matriz intermicrobiana do biofilme dental (Cury et al., 2000).

A formação do biofilme dental ocorre inicialmente com a aderência bacteriana à superfície da película adquirida, mediada por adesinas específicas na superfície bacteriana e por receptores no tecido do hospedeiro. Em seguida, ocorre a agregação de bactérias, incapazes de aderir diretamente à película adquirida, àquelas já aderidas, permitindo o desenvolvimento do biofilme dental (Rosan & Lamont, 2000).

Dentre as interações adesina-receptores são conhecidas as ligações via lectinas e hidrofóbicas, a interação eletrostática via Ca⁺⁺ salivar, via IgA-S salivar, interação com glicosiltransferase (GTF) e glucanos, interação com proteínas salivares ácidas ricas em prolina, com a amilase salivar, entre outras. Seja qual for o mecanismo de adesão utilizado, o aspecto mais importante a ressaltar, no estudo da aderência, é que existe um elevado grau de especificidade na interação adesinas-receptores, formando pontes de união, que devem ser firmes e estáveis, para superarem todas as forças que tendem a desalojar a bactéria (De Lorenzo, 2004).

Estudos *in vitro* com tomilho, própolis e cacau (Gebara et al., 1996), própolis e *Arnica montana* (Koo et al., 2002) têm comprovado a ação inibitória de síntese de polissacarídeos insolúveis da matriz intermicrobiana do biofilme dental, abrindo a possibilidade do uso de substâncias naturais como antimicrobianos orais. Nestes estudos, constituintes como flavonóides, 1,8 cineol, mirceno, terpenos, timol, entre outros são identificados e tidos como possíveis compostos ativos. No entanto, poucos relatos foram encontrados sobre a utilização do alecrim sobre microrganismos de relevância clínica em odontologia.

Nesse estudo, o extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. foi efetivo na inibição de aderência de *S. mitis* ATCC 98811, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. sobrinus* ATCC 27609. Porém, esse efeito não foi observado sobre *S. sanguinis* ATCC 10556 (Tabela 3). Corroborando os achados deste estudo, Takarada et al. (2004) afirmam que o óleo essencial de alecrim possui efeito inibitório de

Tabela 1. Concentração inibitória mínima em meio sólido do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

Linhasgens Bacterianas	Concentração do Extrato (EB; mg/mL)					
	Diâmetro do halo de inibição (mm)					
	EB	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 98811	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	15	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	18	15	11	0	0	0
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 27609	15	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	17	13	11	0	0	0

EB= extrato bruto

Tabela 2. Concentração inibitória mínima em meio sólido do gluconato de clorexidina à 0,12% sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

Linhasgens Bacterianas	Concentração do Gluconato de Clorexidina à 0,12%								Diâmetro do halo de inibição (mm)
	SD	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 98811	18	16	14	12	10	0	0	0	0
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	20	18	15	14	12	0	0	0	0
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	18	18	17	14	14	0	0	0	0
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 27609	24	24	23	20	17	10	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	23	22	21	19	17	15	12	10	0

SD= sem diluição

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* e gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

Linhasgens Bacterianas	Extrato hidroalcoólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> (CIMA)		Gluconato de clorexidina à 0,12%
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 98811	1:8		1:16
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	0		1:16
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	1:16		1:16
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 27609	1:8		1:32

aderência sobre *Streptococcus mutans*.

O estudo comparativo da ação do extrato de *Rosmarinus officinalis* com o gluconato de clorexidina, revelou igual atividade de inibição de síntese de glucano para o extrato e a clorexidina em relação a *S. mutans* ATCC 25175.

CONCLUSÃO

Os resultados do estudo aqui descrito sugerem que o alecrim possui compostos bioativos com atividade antimicrobiana *in vitro* sobre bactérias orais planctônicas. Tais achados são promissores, visto que os microrganismos neste estudo estão envolvidos na formação do biofilme dental. No entanto, a relevância clínica destes achados necessita de avaliação utilizando modelos de estudo que possam reproduzir situações mais próximas àquelas encontradas na cavidade oral. Ainda, é oportuno ressaltar que este estudo não teve a pretensão de buscar mais um antimicrobiano oral, mas, sim, a busca de um fitoterápico a ser utilizado em odontologia, em situações precisas,

onde a remoção mecânica do biofilme dental deva ser auxiliada, dentro de uma estratégia racional de prevenção de infecções orais biofilme-dependentes, contribuindo para utilização, de modo seguro e específico, de fontes terapêuticas disponíveis na flora brasileira.

REFERÊNCIAS

- Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol* 37: 124-130.
- Albuquerque UP, Hanazaki N 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev Bras Farmacogn* 16(Supl.): 678-689.
- Alonso JR 1998. *Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas*. Isis: Buenos Aires.
- Barbosa-Filho JM, Vasconcelos THC, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RAG, Guedes DN, Falcão HS, Moura MD, Diniz MFFM, Modesto-Filho J 2005. Plants

- and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Rev Bras Farmacogn* 15: 392-413.
- Barbosa-Filho JM, Medeiros KCP, Diniz MFFM, Batista LM, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Almeida JRGS, Quintans-Júnior LJ 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn* 16: 258-285.
- Barnett ML 2003. The rote of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc* 134: 699-704.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 41: 435-464.
- Cury JA, Rocha EP, Francisco SB, Koo H, Del Bel Cury AA 2000. Effect of saccharin on antibacterial of chlorhexidine gel. *Braz Dent J* 11: 29-34.
- De Lorenzo JL 2004. *Microbiologia para o estudante de odontologia*. São Paulo: Atheneu.
- Del Bel Cury AA, Rebelo MAB, Cury JA 1994. Efeito de um bochecho contendo clorexidina/ flúor na redução de placa e incorporação de flúor no esmalte. *Rev Bras Odont* 51: 26-29.
- Funke I, Melzig MF 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Rev Bras Farmacogn* 16: 1-5.
- Gebara ECE, Zardeto CGDC, Mayer MPA 1996. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ São Paulo* 10: 251-256.
- Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1302-1309.
- Kreuger MRO, Ternes CE, Mello LL, Cruz AB, Leite SN, Tames DR 2007. The influence of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* on the healing of infected dental alveoli: A histological study in rats. *Rev Bras Farmacogn* 17: 349-355.
- Matos FJA 1997. Living pharmacies. *Ciência e cultura - J Braz Assoc Adv Sci* 49: 409-412.
- Melo AFM, Santos EJV, Souza LFC, Carvalho AAT, Pereira MSV, Higino JS 2006. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. *Rev Bras Farmacogn* 16: 202-205.
- Michilis E 2004. Diagnóstico situacional dos serviços de fitoterapia no Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Farmacogn* 14(Supl. 1): 16-19.
- Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD 2002. *Plantas medicinais: guia para profissional de saúde*. São Paulo: Premier.
- Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M 2007. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Bras Farmacogn* 17: 466-476.
- Organização Mundial de Saúde 1991. *Pautas para la evaluacion de medicamentos herbários*. Ginebra.
- Pereira JV 1998. *Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da Punica granatum Linn. sobre microrganismos formadores de placa bacteriana*. João Pessoa, 92p. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.
- Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF, Higino JS 2006. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Bras Farmacogn* 16: 88-93.
- Pinto VG 2000. *Saúde bucal coletiva*. 4.ed. São Paulo: Santos.
- Rates SMK. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- Rosan B, Lamont R J 2000. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2: 1599-1607.
- Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Sousa FCF 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev Bras Farmacogn* 16: 455-462.
- Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira-Junior JP, Pereira JV, Pereira MSV 2007. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn* 17: 572-577.
- Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC 2008. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Rev Bras Farmacogn* 18: 84-89.
- Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essencial oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 19: 61-64.
- Tôrres AR, Oliveira RAG, Diniz MFFM, Araújo EC 2005. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. *Rev Bras Farmacogn* 15: 373-380.
- Vendruscolo GS, Rates SMK, Mentz LA 2005. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacogn* 15: 361-372.